

ヒト大腸における urocortin および CRF 受容体の 発現の検討

著者	村松 康成
号	1751
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/10097/22137

氏 名（本籍）	むら 村	まつ 松	やす 康	なり 成
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 7 5 1 号			
学位授与年月日	平 成 13 年 3 月 26 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	ヒト大腸における urocortin および CRF 受容体の発現の検討			

	(主 査)			
論文審査委員	教授 本 郷 道 夫	教授 笹 野 公 伸		
	教授 佐々木 巖	教授 下瀬川 徹		

論文内容要旨

研究目的

近年新たに報告された urocortin (Ucn) は, corticotropin-releasing factor (CRF) と 43% の相同性を有する 40 個のアミノ酸からなる神経ペプチドで, CRF 受容体と結合して生理学的活性を発揮すると考えられている。Ucn はヒト組織において, 胎盤, 下垂体, 脳などでその局在が確認されているが, これまでヒト大腸における Ucn および CRF 受容体の発現は明らかにされていない。したがって本研究では,

1. ヒト成人大腸における Ucn の発現
 2. ヒト大腸発生段階における Ucn の発現
 3. ヒト成人大腸における CRF 受容体の発現
- を明らかにすることをその目的とした。

研究方法

成人大腸の標本は, 大腸癌手術時に切除標本から病理学的に正常な部分を採取した。14 例中 11 例は形態学的検討用に, 未固定凍結, 10%ホルマリン固定/パラフィン包埋, 0.5%グルタルアルデヒド含有 4%パラホルムアルデヒド固定/パラフィン包埋の標本を作製した。残り 3 例はフローサイトメトリーおよび RT-PCR 用に, 切除標本から 20-30cm²ほどの肉眼的正常部分を採取し, 粘膜固有層の単核球 (LPMC) と上皮細胞 (Epi) を分離精製した。また, ヒト発生段階における大腸の標本は, 胎生 11 週から生後 6 才計 35 例の 10%ホルマリン固定パラフィン包埋の病理組織標本を用いた。これらの標本を用い, 以下の検討を行った。

1. 免疫組織化学と mRNA *in situ* hybridization にて形態学的に Ucn が大腸のどこに分布するのかを検討した。さらに分離精製した LPMC, Epi 分画を使用し, フローサイトメトリーおよび RT-PCR を行い, Ucn 陽性細胞の characterization について検討した。
2. Ucn が発生段階のどの時期から, 大腸のどの細胞に発現するのかを免疫組織化学にて検討した。
3. 1. で分離精製した LPMC, Epi 分画を用いて, CRF 受容体の mRNA 発現について RT-PCR 法にて検討した。

研究結果

1. Ucn の peptide および mRNA は, 粘膜固有層のマクロファージに主に局在した。特にヒト

マクロファージマーカーである CD68 の陽性細胞とよく対応した。フローサイトメトリーでも、Ucn 陽性細胞は粘膜固有層のマクロファージであることが示された。RT-PCR では、LPMC 分画に Ucn mRNA の発現が認められた。また、免疫染色で上皮細胞にも Ucn は弱く発現していた。mRNA *in situ* hybridization では上皮細胞には明らかに発現を認めなかったものの、RT-PCR では Epi 分画に Ucn mRNA の発現が認められた。

2. Ucn は出生前、新生児期には発現が認められないが、生後 3 ヶ月より粘膜固有層の炎症細胞に発現が認められ、その後陽性細胞数は増加した。また、CD68 陽性細胞も胎生期には発現が認められず、生後より発現し始めその後増加した。連続切片における Ucn 陽性細胞数と CD68 陽性細胞数は、正の相関を示した ($r=0.82$, $P<0.001$)。

3. Ucn, CRF 受容体 1 型および 2α 型の mRNA は、LPMC 分画に発現が認められた。ヒト組織では minor isoform である CRF 受容体 2β 型は、一部の症例の LPMC 分画で発現が認められるものの、より弱いレベルであった。Epi 分画での CRF 受容体の発現は、陰性もしくはごく弱い発現であった。

結 論

Ucn は粘膜固有層のマクロファージにて局所的に産生され、粘膜固有層にある免疫担当細胞に作用し、粘膜免疫の制御を行っている。胎生期のヒト大腸には Ucn の発現は認めず、生後 3 ヶ月より発現し始めその後 Ucn 陽性細胞数は増大した。

研究の意義・独創的な点

本研究は、ヒト大腸において Ucn および CRF 受容体が発現していることを初めて示したものである。Ucn の発現を明らかにしていく過程で大腸粘膜から分離精製した LPMC, Epi 分画を用いた点、Ucn の生理学的意味を考察するために発生段階における Ucn 発現を検討したり前述の LPMC, Epi 分画を利用して CRF 受容体の発現を検討した点は独創的である。これらの検討によって得られた知見は、Ucn の腸管における生理学的意義や種々の疾患における Ucn の意義などを今後解明していく上での基礎的な知見となることが期待できる。

審 査 結 果 の 要 旨

近年新たに発見された urocortin (Ucn) は, corticotropin-releasing factor (CRF) と43%の相同性を有する40個のアミノ酸からなる神経ペプチドで, CRF 受容体と結合して生理学的活性を発揮すると考えられている。Ucn はヒト組織において, 胎盤, 下垂体, 脳などでその局在が確認されているが, これまでヒト大腸における Ucn および CRF 受容体の発現は明らかにされていない。したがって本研究では,

1. ヒト成人大腸における Ucn の発現
2. ヒト大腸発生段階における Ucn の発現
3. ヒト成人大腸における CRF 受容体の発現

を明らかにすることをその目的とした。

成人大腸の標本は, 大腸癌手術時に切除標本から病理学的に正常な部分を採取した。その標本をもとに, 1) 免疫組織化学と mRNA in situ hybridization にて形態学的に Ucn の局在について検討した。また, フローサイトメトリーおよび RT-PCR を行い, Ucn 陽性細胞の characterization について検討した。2) Ucn が発生段階のどの時期から, 大腸のどの細胞に発現するのかを免疫組織化学にて検討した。3) 1. で分離精製した LPMC, Epi 分画を用いて, CRF 受容体の mRNA 発現について RT-PCR 法にて検討した。

その結果, 1) Ucn の Peptide および mRNA は, 粘膜固有層の CD68 の陽性マクロファージに主に局在することを確認した。フローサイトメトリーでも, Ucn 陽性細胞は粘膜固有層のマクロファージであることが示された。RT-PCR では, LPMC 分画に Ucn mRNA の発現が認められた。また, 免疫染色で上皮細胞にも Ucn は弱く発現していた。2) Ucn は出生前, 新生児期には発現が認められないが, 生後3ヶ月より粘膜固有層の炎症細胞に発現が認められ, その後陽性細胞数は増加した。また, CD68 陽性細胞も胎生期には発現が認められず, 生後より発現し始めその後増加した。3) Ucn, CRF 受容体 1 型および 2α 型の mRNA は, LPMC 分画に発現が認められた。minor isoform である CRF 受容体 2β 型は, 一部の症例の LPMC 分画で発現が認められるものの, より弱いレベルであった。以上の所見について確認した。

以上の結果より, Ucn は粘膜固有層のマクロファージにて局所的に産生され, 粘膜固有層にある免疫担当細胞に作用し, 粘膜免疫の制御を行っている。胎生期のヒト大腸には Ucn の発現は認めず, 生後3ヶ月より発現し始めその後 Ucn 陽性細胞数は増大することを確認した。

本研究は, ヒト大腸において Ucn および CRF 受容体が発現していることを初めて示したものである。Ucn の発現を明らかにしていく過程で大腸粘膜から分離精製した LPMC, Epi 分画を用いた点, Ucn の生理学的意味を考察するために発生段階における Ucn 発現を検討したり前述の LPMC, Epi 分画を利用して CRF 受容体の発現を検討した点は独創的である。これらの検討によって得られた知見は, Ucn の腸管における生理学的意義や種々の患における Ucn の意義などを今後解明していく上での基礎的な知見となることが期待される。

よって, 本論文は学位論文に値すると審査員一同で判定した。